



# 东方蜜蜂微孢子虫感染过程中 nce-miR-34537 和靶基因 *PIP5KI* 的表达谱

王紫馨<sup>1#</sup>, 张文德<sup>1#</sup>, 张佳欣<sup>1</sup>, 赵萧<sup>1</sup>, 范小雪<sup>1</sup>, 荆欣<sup>1</sup>, 高旭泽<sup>1</sup>, 陈大福<sup>1,2\*</sup>, 郭睿<sup>1,2\*</sup>

1 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

2 福建省蜂疗研究所, 福建 福州 350002

王紫馨, 张文德, 张佳欣, 赵萧, 范小雪, 荆欣, 高旭泽, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫感染过程中 nce-miR-34537 和靶基因 *PIP5KI* 的表达谱[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 731-744.

WANG Zixin, ZHANG Wende, ZHANG Jiaxin, ZHAO Xiao, FAN Xiaoxue, JING Xin, GAO Xuze, CHEN Dafu, GUO Rui. Expression profiles of nce-miR-34537 and the target gene *PIP5KI* during the infection process of *Nosema ceranae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 731-744.

**摘要:** 【目的】本研究旨在对前期鉴定到的 nce-miR-34537 进行表达和序列验证, 预测 nce-miR-34537 的靶基因并明确其分子特性, 进而检测 nce-miR-34537 及其靶基因在东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)感染意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)工蜂过程的表达谱, 为进一步探究 nce-miR-34537 调控东方蜜蜂微孢子虫感染的功能和作用机制提供基础。【方法】通过 Stem-loop-RT-PCR 和 Sanger 测序验证 nce-miR-34537 的表达和序列。通过生物信息学软件预测 nce-miR-34537 的靶基因 *PIP5KI* (I 型磷脂酰肌醇 4-磷酸-5-激酶基因)的理化性质等分子特性和保守基序, 并构建基于氨基酸序列的系统进化树。采用 RT-qPCR 检测 nce-miR-34537 及其靶基因的表达谱。【结果】nce-miR-34537 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在和表达。nce-miR-34537 共靶向 *PIP5KI* 等 151 个基因。*PIP5KI* 蛋白的分子式为  $C_{882}H_{1364}N_{226}O_{251}S_7$ , 分子量约为 19.37 kDa,

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(32172792); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金(2022J01131334); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202110389027); 福建省大学生创新创业训练计划项目(202210389128, 202210389115)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172792), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01131334), the Master Supervisor Team Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (GUO Rui), the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110389027), and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (202210389128, 202210389115).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Dafu, dfchen826@fafu.edu.cn; GUO Rui, ruiguo@fafu.edu.cn

Received: 2022-06-20; Accepted: 2022-10-12; Published online: 2022-10-31

含 160 个氨基酸和 17 个磷酸化位点, 但不含信号肽, 可同时定位于细胞核、线粒体、细胞质和分泌囊泡。东方蜜蜂微孢子虫的 1 个 PIP5KI (AAJ76\_2700017870) 含 4 个保守基序, 另 1 个 PIP5KI (EEQ82436.1) 含 5 个保守基序。东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫 (*N. apis*) 和鮫鱈思普雷格孢虫 (*Spraguea lophii*) 的 PIP5KI 在进化树中聚为一支, 且东方蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EEQ82436) 与蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EQB60549.1) 的进化距离最近。相较于接种后 1 dpi (day post inoculation), nce-miR-34537 在 2 dpi 上调表达 ( $P>0.05$ ), 而在 4 dpi、6 dpi 和 8 dpi 的表达量均显著下调 ( $P<0.05$ ); PIP5KI 在 2 dpi 表达量显著上调 ( $P<0.05$ ), 在 4 dpi、6 dpi 和 8 dpi 的表达量均显著下调 ( $P<0.05$ )。

**【结论】** nce-miR-34537 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在和表达, 东方蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EEQ82436) 与蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EQB60549.1) 之间亲缘关系最近, nce-miR-34537 及其靶基因 PIP5KI 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中均表现出上升-下降的表达规律, nce-miR-34537 通过正调控 PIP5KI 表达潜在参与调节侵染过程。

**关键词:** 东方蜜蜂微孢子虫; nce-miR-34537; PIP5KI; 表达谱; 生物信息学分析

## Expression profiles of nce-miR-34537 and the target gene PIP5KI during the infection process of *Nosema ceranae*

WANG Zixin<sup>1#</sup>, ZHANG Wende<sup>1#</sup>, ZHANG Jiabin<sup>1</sup>, ZHAO Xiao<sup>1</sup>, FAN Xiaoxue<sup>1</sup>, JING Xin<sup>1</sup>, GAO Xuze<sup>1</sup>, CHEN Dafu<sup>1,2\*</sup>, GUO Rui<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

<sup>2</sup> Institute of Apitherapy of Fujian Province, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** [Objective] To validate expression and sequence of the previously identified nce-miR-34537, predict the target gene of nce-miR-34537 and the molecular characteristics of the gene, determine the expression profiles of nce-miR-34537 and its target gene during the *Nosema ceranae* infection in *Apis mellifera ligustica* workers, so as to provide a foundation for revealing the role of nce-miR-34537 in *N. ceranae* infection. [Methods] Stem-loop-RT-PCR and Sanger sequencing were performed to verify the expression and sequence of nce-miR-34537. The molecular properties and conserved motifs of the target gene of nce-miR-34537, PIP5KI (encoding type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase), were predicted via bioinformatics tools. The phylogenetic tree was constructed based on amino acid sequences. The expression profiles of nce-miR-34537 and its target genes were determined via RT-qPCR. [Results] The existence and expression of nce-miR-34537 were confirmed in *N. ceranae* spores. nce-miR-34537 can target 151 genes including PIP5KI. The deduced PIP5KI protein was predicted to have the molecular formula of C<sub>882</sub>H<sub>1364</sub>N<sub>226</sub>O<sub>251</sub>S<sub>7</sub> and the molecular weight of 19.37 kDa and contain 160 residues, 17 phosphorylation sites, and no classical signal peptide. PIP5KI can simultaneously locate in the nucleus, mitochondrion, cytoplasm, and secretory vesicles. *N. ceranae* PIP5KI (AAJ76\_2700017870) contained four conserved motifs, while the

other PIP5KI (EEQ82436.1) contained five motifs. PIP5KI proteins in *N. ceranae*, *N. apis*, and *Spraguea lophii* were grouped into one clade in the phylogenetic tree, and *N. ceranae* PIP5KI (EEQ82436) and *N. apis* PIP5KI (EQB60549.1) had the closest evolutionary distance. Compared with that 1 dpi (day post inoculation), the expression level of nce-miR-34537 was up-regulated at 2 dpi ( $P>0.05$ ) and down-regulated at 4, 6, and 8 dpi ( $P<0.05$ ), and that of *PIP5KI* was up-regulated at 2 dpi ( $P<0.05$ ) and down-regulated at 4, 6, and 8 dpi ( $P<0.05$ ). **[Conclusion]** nce-miR-34537 is expressed in *N. ceranae* spores. *N. ceranae* PIP5KI (EEQ82436) and *N. apis* PIP5KI (EQB60549.1) have the closest genetic relationship. The expression of both nce-miR-34537 and the target gene *PIP5KI* is first up-regulated and then down-regulated during *N. ceranae* infection in *A. m. ligustica* workers. The results indicate that nce-miR-34537 may participate in the infection process via positive regulation of *PIP5KI* expression.

**Keywords:** *Nosema ceranae*; nce-miR-34537; *PIP5KI*; expression profile; bioinformatics analysis

东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)是一种专性寄生成年蜜蜂中肠上皮细胞的单细胞真菌病原, 可对蜜蜂宿主造成细胞结构破坏、寿命缩短、哺育力下降和免疫抑制等不良影响<sup>[1]</sup>。目前, 东方蜜蜂微孢子虫呈全球性分布, 威胁养蜂业的可持续发展。意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)是西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的优良亚种, 在我国养蜂生产中广泛使用, 具有重要的生态和经济价值<sup>[2]</sup>。

miRNA 是一类长度介于 19–24 nt 的内源性小非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 可通过靶向结合 mRNA 在转录后水平调控基因表达<sup>[3]</sup>。借助日趋成熟的二代测序技术, 人们在黄曲霉<sup>[4]</sup> (*Aspergillus flavus*)、罗伯茨绿僵菌<sup>[5]</sup> (*Metarhizium robertsii*)和蜜蜂球囊菌<sup>[6]</sup> (*Ascospaera apis*)等真菌中陆续鉴定到大量 miRNA。Huang 等<sup>[7]</sup>通过对东方蜜蜂微孢子虫接种 6 d 的西方蜜蜂工蜂中肠进行转录组测序, 鉴定到 6 个 miRNA (JL-1、JL-2、JL-3、JL-4、JL-5 和 JL-6); 基于新组装的基因组鉴定出 3 个 miRNA (JL-7、JL-8 和 JL-9)<sup>[8]</sup>。近期, 笔者团队结合 small RNA-Seq 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中鉴定到 10 个 miRNA<sup>[9]</sup>, 并证实了其中 4 个 miRNA

(nce-miR-23928、nce-miR-12220、nce-miR-10660 和 nce-miR-15338)的真实存在和表达<sup>[10-13]</sup>。

本研究对前期预测到的 nce-miR-34537 进行表达和序列验证, 进而对 nce-miR-34537 及其靶基因进行生物信息学, 并检测 nce-miR-34537 和靶基因在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程的表达谱, 以期解析靶基因的分子特性, 明确 nce-miR-34537 及其靶基因在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中的表达规律, 并揭示 nce-miR-34537 在侵染过程的潜在调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试生物材料

未受东方蜜蜂微孢子虫感染的工蜂取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)教学蜂场的意蜂蜂群, 前期研究中已利用特异性引物对 2 种常见的真菌病原(东方蜜蜂微孢子虫和蜜蜂微孢子虫)及 7 种常见的病毒(蜜蜂残翅病毒、克什米尔蜜蜂病毒、以色列蜜蜂麻痹病病毒、蜜蜂慢性麻痹病病毒、黑蜂王台病毒、阿肯色蜜蜂病毒和囊状幼虫病病毒)进行 RT-PCR 检测<sup>[14]</sup>, 结果均为阴性, 说明本研究使用的意蜂蜂群未受上述病原感染。东方蜜蜂微孢子虫感染的工蜂取

自福州市闽侯县荆溪源安蜂场的意蜂蜂群。东方蜜蜂微孢子虫孢子由福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护实验室制备和保存<sup>[9]</sup>。

## 1.2 nce-miR-34537 的 Stem-loop RT-PCR 与 Sanger 测序

根据 nce-miR-34537 序列,参照吴鹰等<sup>[11]</sup>的方法设计特异性 Stem-loop 引物和上游引物(F)及通用下游引物(R)(表 1),委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。利用 RNA 抽提试剂盒(Promega 公司)提取东方蜜蜂微孢子虫孢子样品的总 RNA 作为模板,利用 Stem-loop 引物进行反转录,得到的 cDNA 作为模板进行常规 PCR。产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。按张文德等<sup>[9]</sup>的方法进行目的片段回收和 TA 克隆。将 PCR 鉴定结果阳性的菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。

## 1.3 nce-miR-34537 的靶基因预测与分析

前期研究中,笔者团队已对东方蜜蜂微孢子虫纯净孢子样品进行 RNA 提取、cDNA 建库和 RNA-Seq 测序,获得了高质量转录组数据<sup>[15]</sup>。参照张文德等<sup>[9]</sup>的方法联用 TargetScan、miRanda 与 RNAhybrid 软件预测 nce-miR-34537 的靶基因。通过 Blast 工具将上述靶基因比对到 GO 数据库(<https://www.omicshare.com/tools/Home/>

Soft/gogsea)、KEGG 数据库(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/pathwaygsea>)、Nr 数据库(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA>)以及 Swissprot 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/swissprot>)以获得相应注释。根据靶向结合关系构建 nce-miR-34537 与靶基因间的调控网络,进而通过 Cytoscape 软件进行可视化。

## 1.4 PIP5KI 的生物信息学分析

根据靶向预测结果,同时参考东方蜜蜂微孢子虫的生物学背景以及相关研究报道<sup>[16-23]</sup>,筛选出一个关键靶基因——I 型磷脂酰肌醇 4-磷酸-5-激酶基因(*type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, PIP5KI*)。利用 NCBI 数据库上的 ORF 工具预测 PIP5KI 编码蛋白的氨基酸序列。通过 Expasy 网站(<https://www.expasy.org/>)上的 ProtParam、ProtScale 和 SWISS-model 等软件分析 PIP5KI 的理化性质、亲水性和三级结构;利用 SignalP 4.1 Server、NetPhos 3.1 Server、TMHMM 及 SOPMA<sup>[24]</sup>软件预测 PIP5KI 的信号肽、磷酸化位点、跨膜结构域及二级结构。使用 PSORTII (<https://www.genscript.com/psort.html>)在线软件<sup>[25]</sup>进行 PIP5KI 的亚细胞定位预测。使用 MEME 5.4.1 软件<sup>[26]</sup>预测东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 PIP5KI 的保守基序,选择默认参

表 1 本研究使用的引物信息

Table 1 Information about primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
nce-miR-3437-Loop	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATTCAATC	Reverse transcription
nce-miR-34537-F	CGCGCGTTTTAAGTATTCTG	RT-PCR and qPCR
nce-miR-34537-R	CTCAACTGGTGTCTGGAG	RT-PCR and qPCR
nce-5s-F	CGAGCGGTTTCCCATCTCAGTA	qPCR
nce-5s-R	AAAACACCGGAACCTCGTCAGCT	qPCR
PIP5KI-F	GTGTCAATACAATACCGTGCAA	qPCR
PIP5KI-R	TGAGTGAACAAAGGCACAGAA	qPCR
actin-F	CAAAGCCTGTGATGTGGA	qPCR
actin-R	GCCAAGTTTCTGATTTCCC	qPCR

数。利用 Blast 工具将东方蜜蜂微孢子虫 PIP5KI 氨基酸序列比对到 NCBI GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 以搜索序列相似性较高的其他物种的 PIP5KI。通过 Mega 11.0 软件<sup>[27]</sup>对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 PIP5KI 进行氨基酸序列多重比对, 采用邻接法构建基于 PIP5KI 的系统进化树。

### 1.5 东方蜜蜂微孢子虫侵染的意蜂工蜂中肠样品制备

选取实验蜂群中即将出房的封盖子脾迅速提至实验室置于(34.0±0.5) °C 培养箱中, 收集刚出房的 1 日龄工蜂, 饥饿处理 2 h 后单头饲喂接种 5 μL 含有 10<sup>6</sup> 个东方蜜蜂微孢子虫孢子的 50% (质量体积分数) 蔗糖溶液, 待食后将工蜂放入干净的塑料盒(35 头/盒)。在饲料盒上方插入一支饲喂器, 内含 2 mL 50% (质量体积分数) 蔗糖溶液, 置于培养箱中饲养, 每 24 h 更换饲喂器中的蔗糖溶液(2 mL), 分别在接种后 1 dpi (day post inoculation)、2 dpi、4 dpi、6 dpi 和 8 dpi 在超净台中拉取工蜂中肠组织。每 3 只中肠放入 1 个 RNA-Free 离心管, 液氮速冻后置于-80 °C 超低温冰箱保存备用。上述实验进行 3 次生物重复。

### 1.6 nce-miR-34537 的表达谱测定

利用 RNA 抽提试剂盒(Promega 公司)分别提取上述中肠样品总 RNA 作为模板, 利用 Stem-loop 引物进行反转录得到 nce-miR-34537 的 cDNA 模板。同时利用 Oligo dT 引物和 Random 6 mer 引物按 1:1 混匀进行反转录得到东方蜜蜂微孢子虫内参 5S rRNA 的 cDNA 模板。参照 SYBR Green 试剂(翌圣公司)说明书进行 qPCR 反应。反应在 QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)上进行。反应体系和程序按照祝智威等<sup>[28]</sup>的报道进行设置。每个反应均设置 3 个技术重复和 3 个平行重复。以 1 dpi 为参照, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[29]</sup>计算 nce-miR-34537 在 2、4、

6 和 8 dpi 的相对表达量。使用 GraphPad Prism 8 软件进行数据处理和绘图。采用 SPSS 软件对靶基因在各时间点的相对表达量进行单因素方差分析(ANOVA), 以  $P < 0.05$  为显著性阈值。采用 Tukey 检验法和字母显著标记法对实验数据进行两两比较分析。

### 1.7 靶基因 PIP5KI 的表达谱测定

根据 PIP5KI 的序列设计合成特异性上下游引物(表 1)。采用 qPCR 检测 PIP5KI 在 2、4、6 和 8 dpi 的相对表达量。以肌动蛋白基因 *actin* (GenBank 登录号: AB023025.1) 作为内参。测定和分析的方法同 1.6 节。

## 2 结果与分析

### 2.1 nce-miR-34537 的表达和序列验证

Stem-loop RT-PCR 能够扩增出符合预期大小(约 100 bp)的目的片段(图 1A)。Sanger 测序结果显示, 目的片段序列与基于二代测序数据预测出的 nce-miR-34537 序列(UUUUAAGUAU UCUGGAUUGAAU)一致(图 1B)。上述结果证实 nce-miR-34537 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在和表达。

### 2.2 nce-miR-34537 的靶基因分析

nce-miR-34537 共靶向 151 个基因, nce-miR-34537 与靶基因之间可形成 1 个较复杂的调控网络(图 2)。数据库注释结果显示, 3 个靶基因可注释到 Nr 数据库的 60S 核糖体蛋白 124、20S 蛋白酶体 β 亚基和甲硫氨酸 tRNA 合成酶, 其余 148 个靶基因均注释到假定蛋白; 有 75 个靶基因可注释到 Swiss-prot 数据库的色氨酸 tRNA 连接酶、锌指蛋白和 ATP、ADP 载体蛋白等蛋白; 有 81 个靶基因可注释到 GO 数据库, 包括代谢进程和细胞进程等 15 个生物学进程相关条目(图 3A), 细胞成分和大分子化合物等 8 个细胞组分相关条目, 催化活性和转运蛋

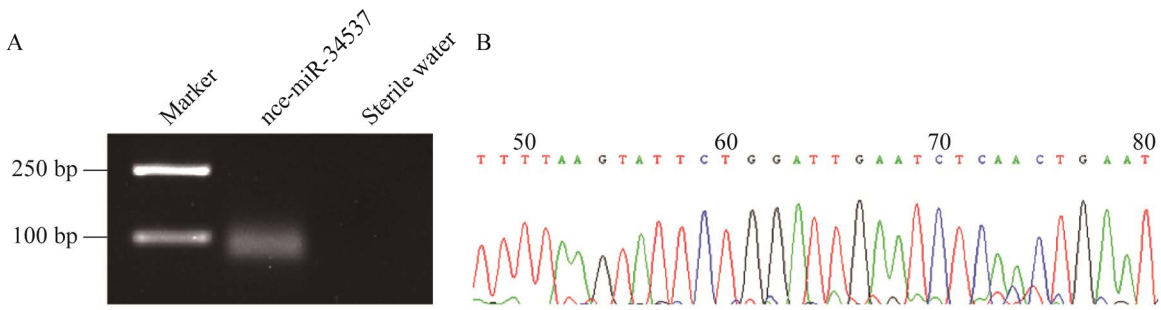


图 1 *nce-miR-34537* 扩增产物的琼脂糖电泳(A)和 Sanger 测序(B)

Figure 1 Agarose gel electrophoresis (A) and Sanger sequencing (B) of the amplified product from *nce-miR-34537*.

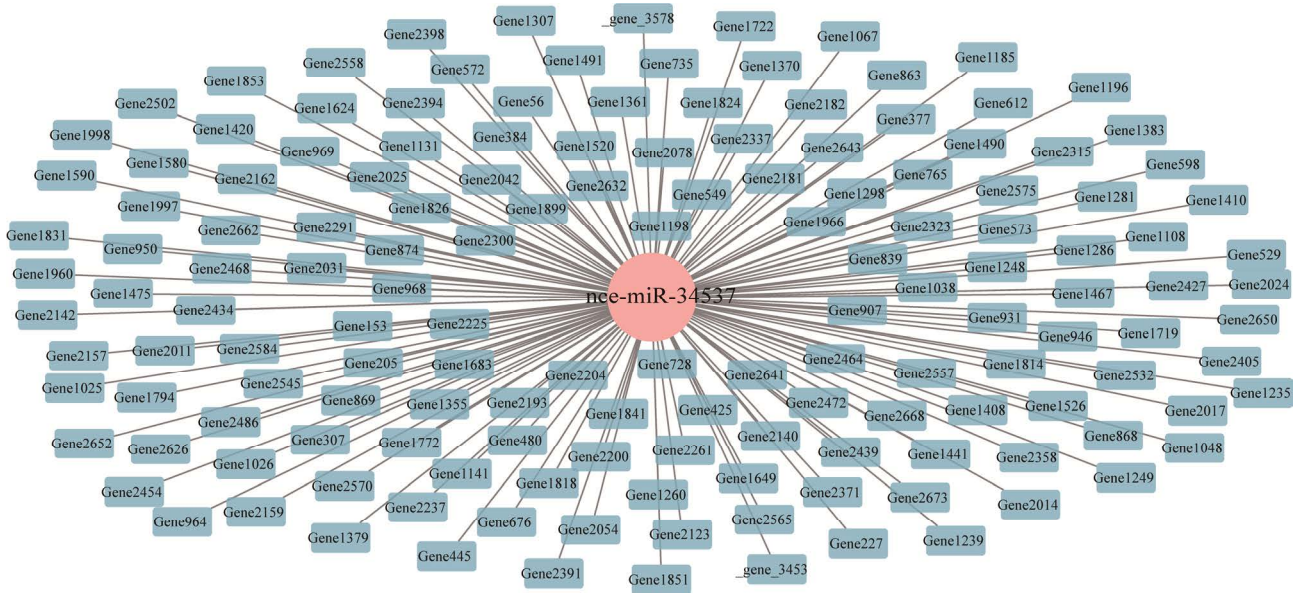


图 2 *nce-miR-34537* 与靶基因之间的调控网络

Figure 2 Regulatory network between *nce-miR-34537* and target genes.

白活性等 5 个分子功能相关条目; 有 46 个靶基因可注释到 KEGG 数据库代谢途径、次生代谢产物的生物合成及氨酰基-tRNA 的生物合成等 44 条通路(图 3B)。

### 2.3 PIP5KI 蛋白的分子特性

*PIP5KI* 基因共含有 483 个核苷酸, 编码 160 个氨基酸。*PIP5KI* 蛋白的分子式为  $C_{882}H_{1364}N_{226}O_{251}S_7$ , 分子量约为 19.37 kDa, 脂溶系数为 85.87, 等电点为 8.94。PIP5KI 中含量最高的氨基酸为赖

氨酸(14.40%), 含量最低的氨基酸为蛋氨酸(1.20%)、脯氨酸(1.20%)和色氨酸(1.20%)。另外, PIP5KI 包含 22 个负电荷氨基酸, 其中天冬氨酸和谷氨酸分别为 14 和 8 个; 包含 28 个正电荷氨基酸, 其中精氨酸和赖氨酸分别为 5 和 23 个。

PIP5KI 的平均亲水系数为 -0.65, 亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸(图 4A), 说明该蛋白可能为亲水性蛋白。此外, PIP5KI 中不存在典型的信号肽, 说明其可能为胞内蛋白(图 4B)。在

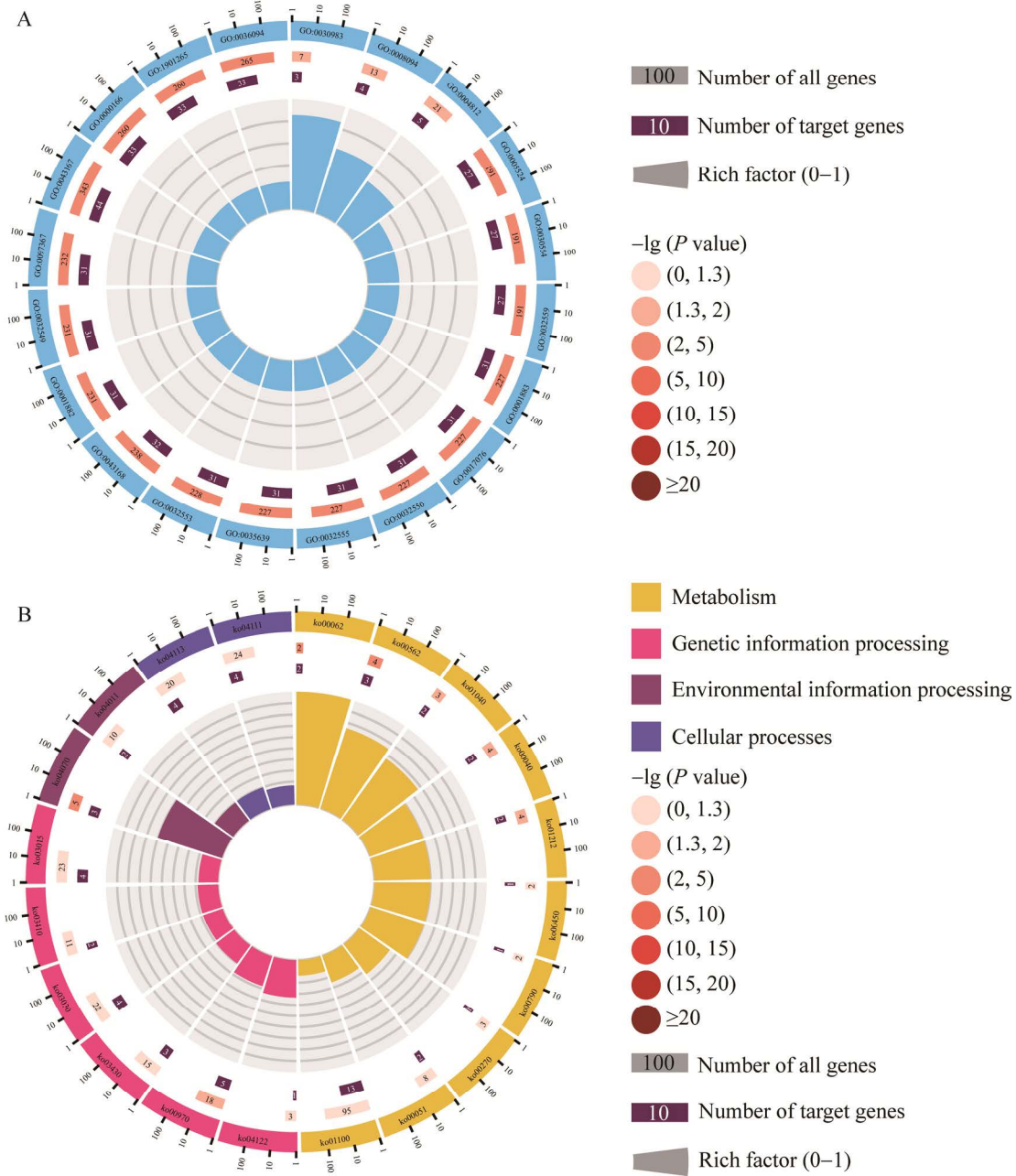


图 3 nce-miR-34537 的靶基因的 GO (A)和 KEGG (B)数据库注释

Figure 3 GO (A) and KEGG (B) database annotation of nce-miR-34537 targeted genes.

PIP5KI 中预测到 7 个丝氨酸磷酸化位点、7 个酪氨酸磷酸化位点和 3 个苏氨酸磷酸化位点(图 4E)。PIP5KI 含有 66 个(41.25%)  $\alpha$ -螺旋, 30 个(18.75%)延长链, 7 个(4.38%)  $\beta$ -转角, 57 个(35.62%)无规则卷曲(图 4C)。三级结构分

析结果显示 PIP5KI 的模板为 7qpn.1.A, PIP5KI 与 7qpn.1.A 的同源性为 50.00% (图 4D)。亚细胞定位预测结果显示, PIP5KI 可同时定位于细胞核、线粒体、细胞质和分泌囊泡, 占比分别为 78.30%、13.00%、4.30%和 4.30%。

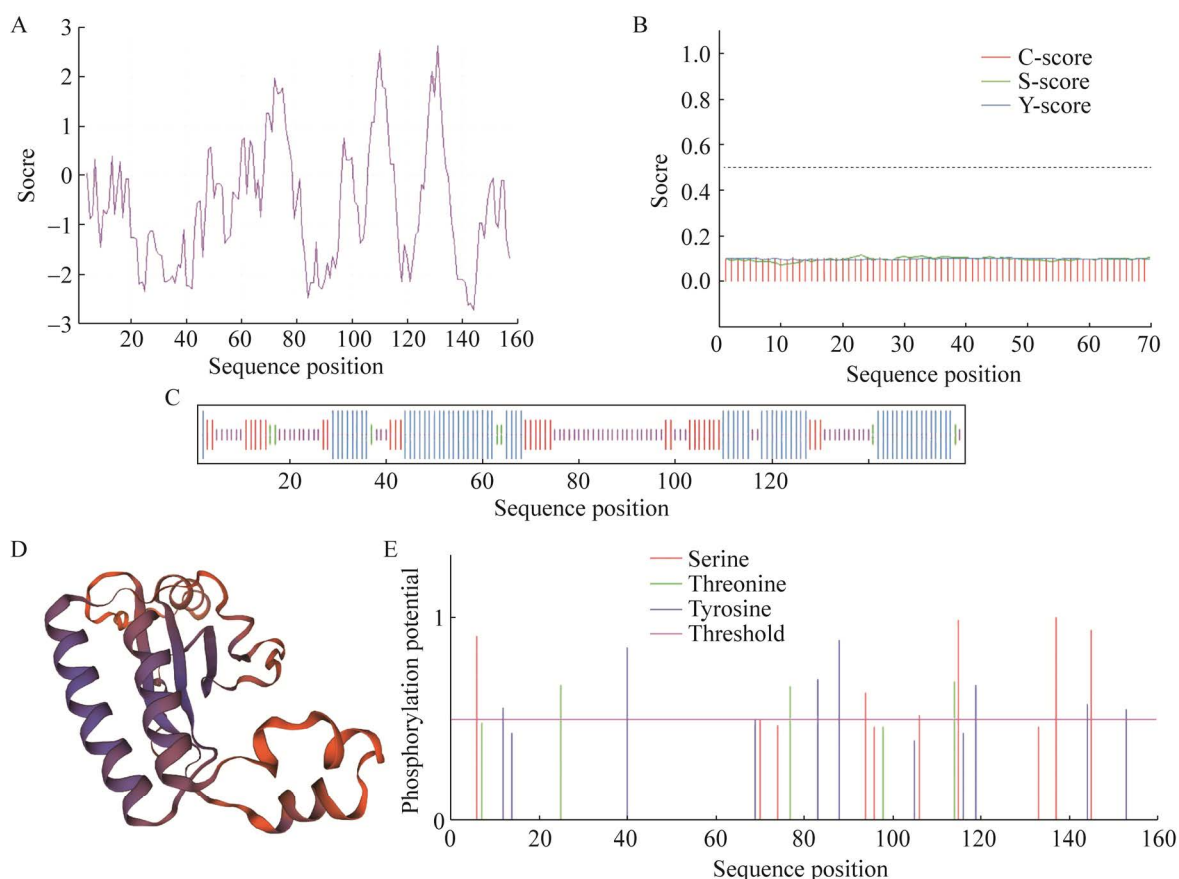


图 4 PIP5KI 的亲水性(A)、信号肽(B)、二级结构(C)、三级结构(D)和磷酸化位点(E)

Figure 4 Hydrophilicity (A), signal peptide (B), secondary structure (C), tertiary structure (D), and phosphorylation site (E) of PIP5KI.

## 2.4 PIP5KI 蛋白的保守基序分析

搜索结果显示东方蜜蜂微孢子虫含有 2 个 PIP5KI, 而蜜蜂微孢子虫(*N. apis*)、柑橘凤蝶(*Papilio xuthus*)、兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*)、颗粒病微孢子虫(*Nosema granulosis*)、海伦脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon hellem*)、肠脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis*)、小亚德里亚共生甲藻(*Symbiodinium microadriaticum*)和鮫鱈思普雷格孢虫(*S. lophii*)均仅含有 1 个 PIP5KI。东方蜜蜂微孢子虫的 2 个 PIP5KI (AAJ76\_2700017870 和 EEQ82436)的氨基酸序列多重比对结果如图 5 所示。

预测结果显示东方蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI

(AAJ76\_2700017870)含 4 个保守基序: Motif 1、Motif 3、Motif 4 和 Motif 5; 鮫鱈思普雷格孢虫和小亚德里亚共生甲藻的 PIP5KI 也含 4 个保守基序: Motif 1、Motif 2、Motif 3 和 Motif 4; 而东方蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EEQ82436.1)与蜜蜂微孢子虫、柑橘凤蝶、兔脑炎微孢子虫、颗粒病微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫的 PIP5KI 均含 5 个保守基序: Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 和 Motif 5 (图 6)。

## 2.5 PIP5KI 蛋白的系统进化分析

系统进化分析结果显示, 东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫和鮫鱈思普雷格孢虫聚为一个大支, 而兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、



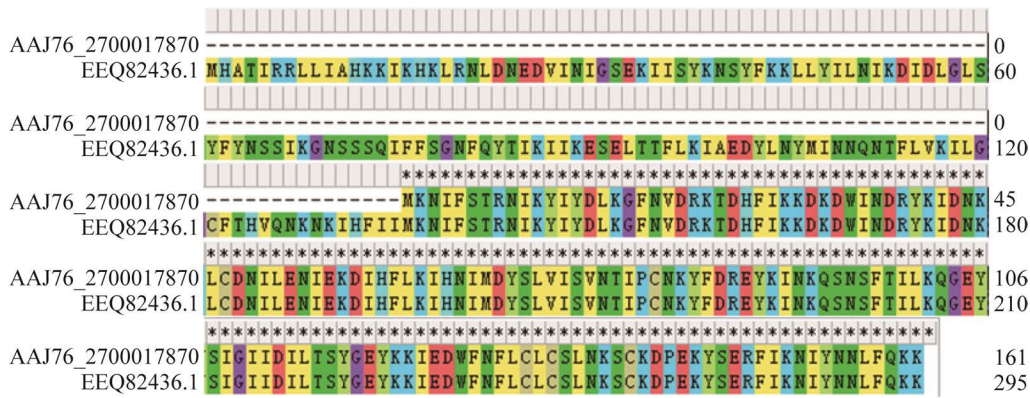


图 5 东方蜜蜂微孢子虫的 2 个 PIP5KI 的多重序列比对结果

Figure 5 Multiple alignment results of amino sequences of two PIP5KI in *Nosema ceranae*. \* indicates the same base in AAJ76\_2700017870 and EEQ82436.

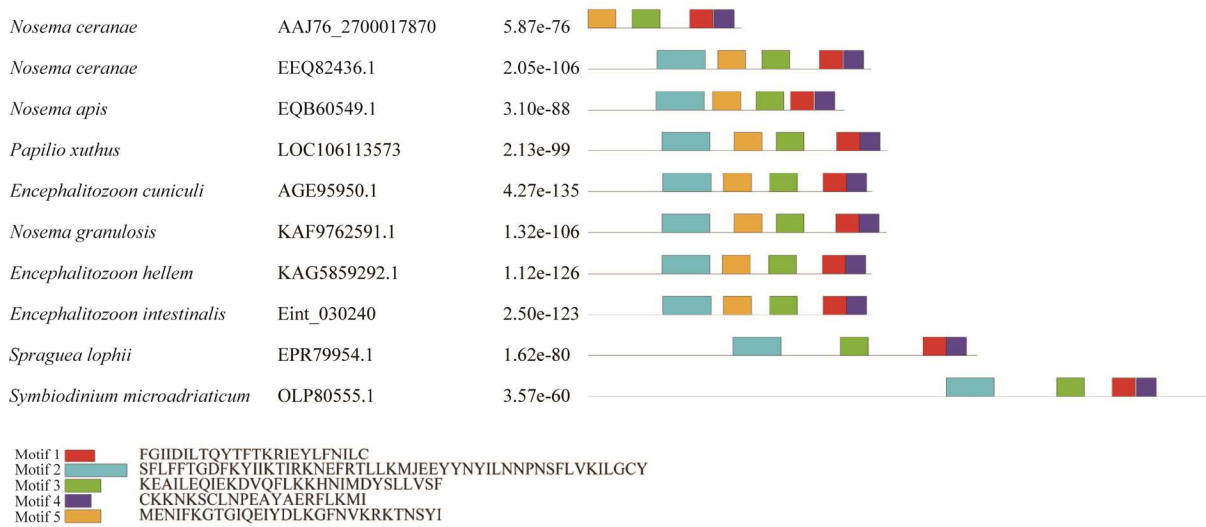


图 6 东方蜜蜂微孢子虫和其他 9 个物种的 PIP5KI 蛋白的保守基序比较

Figure 6 Comparison of conserved motifs in PIP5KI proteins in *Nosema ceranae* and other nine species.

海伦脑炎微孢子虫、柑橘凤蝶以及颗粒病微孢子虫的 PIP5KI 聚为另一个大支, 小亚德里亚共生甲藻单独聚为一支(图 7); 进一步分析发现东方蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EEQ82436)与蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EQB60549.1)聚为一支, 进化距离最近。

### 2.6 nce-miR-34537 和 PIP5KI 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程的表达谱

RT-qPCR 结果显示相较于 1 dpi, nce-miR-

34537 在 2 dpi 上调表达 1.09 倍, 但组间差异不显著( $P>0.05$ ), 在 4、6 和 8 dpi 的表达量均显著下调( $P<0.05$ ), 下调倍数分别为 225.15 倍、3 085.90 倍和 9.50 倍(图 8A)。靶基因 PIP5KI 与 nce-miR-34537 的靶向结合示意图如图 8B 所示。相比于 1 dpi, PIP5KI 在 2 dpi 表达量显著上调 2.51 倍( $P<0.05$ ), 在 4、6 和 8 dpi 的表达量均显著下调( $P<0.05$ ), 下调倍数分别为 15.51 倍、32.61 倍和 15.70 倍(图 8C)。

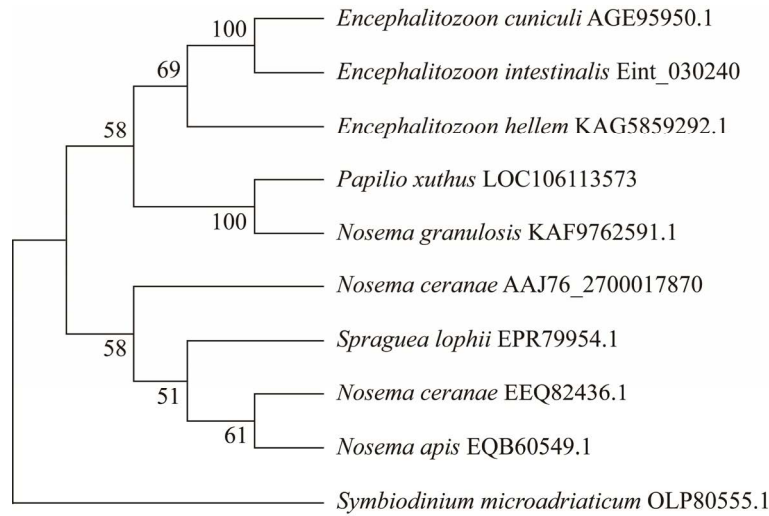


图 7 邻接法构建基于 **PIP5KI** 蛋白的东方蜜蜂微孢子虫与其他 8 个物种的系统进化树

Figure 7 Phlogenetic tree of *Nosema ceranae* and other eight species based on PIP5KI protein by neighbor-joining method. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset.

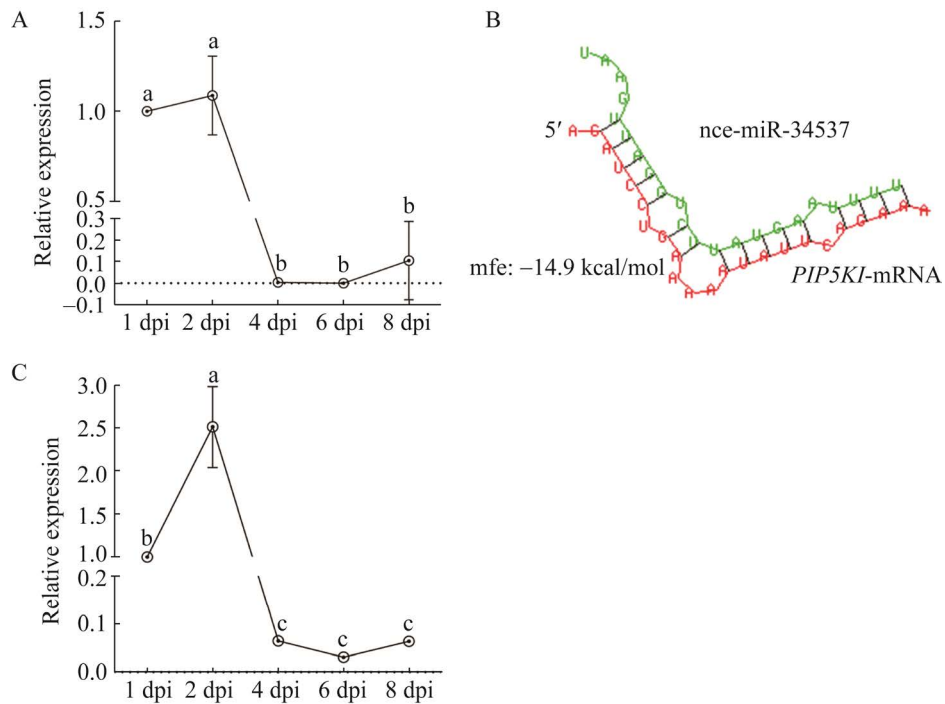


图 8 **nce-miR-34537** 及靶基因 **PIP5KI** 在东方蜜蜂微孢子虫感染过程的表达谱

Figure 8 Expression profiles of *nce-miR-34537* and target gene *PIP5KI* during the infection process of *Nosema ceranae*. A: Expression profile of *nce-miR-34537*. B: Putative targeting relationship between *PIP5KI* and *nce-miR-34537*. C: Expression profile of *PIP5KI*. Data are displayed as mean±SE, the same lowercase letters above the curve indicate non-significant difference ( $P>0.05$ ), while the different lowercase letters above the curve indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论与结论

此前, 我们已证实 *nce-miR-23928*、*nce-miR-12220*、*nce-miR-10660* 和 *nce-miR-15338* 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中的存在和表达<sup>[10-13]</sup>。本研究中, Stem-loop RT-PCR 和 Sanger 测序结果证实东方蜜蜂微孢子虫孢子中 *nce-miR-34537* 的真实存在和表达。这为深入开展上述 6 个 miRNA 的功能和作用机制研究提供了实验依据。本研究发现, 有 81 个靶基因可注释到 GO 数据库的 28 个条目, 包括代谢进程等 15 个生物学进程相关条目、细胞组分等 8 个细胞组分相关条目及催化活性等 5 个分子功能相关条目; 有 46 个靶基因可注释到 KEGG 数据库的 44 条通路, 包括氨酰 tRNA 的生物合成和 DNA 复制等遗传信息处理通路、磷酸肌醇代谢和次生代谢产物的生物合成等能量代谢通路、细胞内吞和吞噬体等细胞信号通路。上述结果表明 *nce-miR-34537* 潜在调节东方蜜蜂微孢子虫的新陈代谢和信号转导的诸多方面。

本研究在东方蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (AAJ76\_2700017870) 中预测到 4 个保守基序 (Motif 1、Motif 3、Motif 4 和 Motif 5), 在鮫鱈思普雷格孢虫的 *PIP5KI* 蛋白中也预测到 4 个保守基序 (Motif 1、Motif 2、Motif 3 和 Motif 4), 而在东方蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (EEQ82436.1) 与蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、颗粒病微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫 5 种微孢子虫中预测到 5 个保守基序 (Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 和 Motif 5)。这说明东方蜜蜂微孢子虫的 2 个 *PIP5KI* (AAJ76\_2700017870 和 EEQ82436.1) 之间具有一定的保守性, 东方蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (EEQ82436.1) 与蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、颗粒病微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫等 5 种微孢

子虫的 *PIP5KI* 之间保守性较高。进一步的系统进化结果显示, 东方蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (AAJ76\_2700017870 和 EEQ82436.1) 与蜜蜂微孢子虫、鮫鱈思普雷格孢虫的 *PIP5KI* 聚为一支, 但东方蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (EEQ82436) 与蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (EQB60549.1) 的进化距离更近。上述结果表明东方蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (EEQ82436) 与姐妹种蜜蜂微孢子虫的 *PIP5KI* (EQB60549.1) 之间亲缘关系最近。推测东方蜜蜂微孢子虫的 2 个 *PIP5KI* 在长期进化过程中发生了分歧。

本研究发现相较于 1 dpi, *nce-miR-34537* 在 4、6 和 8 dpi 的表达量均显著下调, 说明 *nce-miR-34537* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂的过程中发生差异表达, 表现出下降的表达趋势, 暗示 *nce-miR-34537* 参与调控侵染过程。

磷脂酰肌醇途径可将胞外信号转化为胞内信号进而介导一系列生物学过程。*PIP5KI* 是体内合成 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 [phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PI(4,5)P<sub>2</sub>] 及磷脂酰肌醇途径发挥功能的关键酶, 能催化产生 PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> 发生磷酸化, 产生第二信使 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>], 进而调节细胞生长和凋亡等生命活动<sup>[30]</sup>。*PIP5KI* 的研究多集中在人类, 已被证实在人类神经发育中起重要作用<sup>[31]</sup>。此外, *PIP5K* 和 PI(4,5)P<sub>2</sub> 还能共同参与调节信号转导、细胞骨架、DNA 合成和囊泡运输等众多生物学过程<sup>[32]</sup>。*MAPK* 信号通路在细胞壁组装和完整性、细胞周期控制、细胞器的降解、形态发生、有性生殖和应激反应等方面起到关键作用<sup>[33]</sup>。本研究中, *PIP5KI* 可注释到 *MAPK* 信号通路, 暗示 *nce-miR-34537* 可能通过影响 *MAPK* 信号通路调节东方蜜蜂微孢子虫侵染。另外, *PIP5KI* 与 *nce-miR-34537* 之间存在靶向关系 (图 4B); 相比于 1 dpi, *PIP5KI* 在 2 dpi 表

达量显著上调,而在 4 dpi、6 dpi 和 8 dpi 的表达量均显著下调,表现出上升-下降的表达趋势(图 4C),与 nce-miR-34537 的表达趋势一致,说明二者间存在潜在的正向调控关系。有趣的是,前期研究发现在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中,nce-miR-12220 与靶基因 *KRAB-A* 和 *γ-tubulin* 也存在潜在的正向调控关系<sup>[11]</sup>。在动植物和微生物的相关研究中,miRNA 多发挥负调控基因表达的作用<sup>[34]</sup>。近年来,随着研究的逐渐深入,人们发现 HCV 病毒和水稻 *Oryza sativa* 等的 miRNA 也可以通过正调控基因表达发挥重要功能<sup>[35-36]</sup>。nce-miR-34537 与 nce-miR-12220 通过正调控靶基因表达进而调节东方蜜蜂微孢子虫侵染的机制是下一步的工作重点。

综上所述,nce-miR-34537 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在和表达,东方蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EEQ82436)与蜜蜂微孢子虫的 PIP5KI (EQB60549.1)之间亲缘关系最近。nce-miR-34537 及其靶基因 *PIP5KI* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中均表现出上升-下降的表达规律,nce-miR-34537 通过正调控 *PIP5KI* 表达潜在参与调节东方蜜蜂微孢子虫的侵染过程。

## 参考文献

- [1] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.  
LIANG Q, CHEN DF. Bee protection[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009 (in Chinese).
- [2] 曾志将. 养蜂学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2017.  
ZENG ZJ. Apiculture[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [3] 杨婕, 谢苗, 徐雪娇, 白建林, 尤民生. 昆虫 miRNA 研究进展[J]. 昆虫学报, 2021, 64(2): 259-280.  
YANG J, XIE M, XU XJ, BAI JL, YOU MS. Research progress of insect miRNAs[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 64(2): 259-280 (in Chinese).
- [4] BAI YH, LAN FX, YANG WQ, ZHANG F, YANG KL, LI ZG, GAO PL, WANG SH. sRNA profiling in *Aspergillus flavus* reveals differentially expressed miRNA-like RNAs response to water activity and temperature[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 81: 113-119.
- [5] 李琼, 崔春来, 宋红生, 王四宝. mro-miR-33 在绿僵菌产孢中的作用[J]. 菌物学报, 2017, 36(6): 671-678.  
LI Q, CUI CL, SONG HS, WANG SB. The effects of mro-miR-33 on the conidial production in *Metarhizium robertsii*[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(6): 671-678 (in Chinese).
- [6] 郭睿, 王海朋, 陈华枝, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 赵红霞, 陈大福. 蜜蜂球囊菌的 microRNA 鉴定及其调控网络分析[J]. 微生物学报, 2018, 58(6): 1077-1089.  
GUO R, WANG HP, CHEN HZ, XIONG CL, ZHENG YZ, FU ZM, ZHAO HX, CHEN DF. Identification of *Ascospaera apis* microRNAs and investigation of their regulation networks[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1077-1089 (in Chinese).
- [7] HUANG Q, EVANS JD. Identification of microRNA-like small RNAs from fungal parasite *Nosema ceranae*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 107-109.
- [8] SHAO SS, YAN WY, HUANG Q. Identification of novel miRNAs from the microsporidian parasite *Nosema ceranae*[J]. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2021, 93: 104930.
- [9] 张文德, 赵浩东, 孙明会, 余尚骏, 郭意龙, 朱乐冉, 胡颖, 赵萧, 叶亚萍, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫孢子中微小 RNA 的鉴定与分析[J]. 昆虫学报, 2022, 65(6): 708-717.  
ZHANG WD, ZHAO HD, SUN MH, YU KJ, GUO YL, ZHU LR, HU Y, ZHAO X, YE YP, CHEN DF, GUO R. Identification and analysis of microRNAs in *Nosema ceranae* spores[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65(6): 708-717 (in Chinese).
- [10] 张文德, 胡颖, 张凯遥, 钱加琚, 赵红霞, 吉挺, 蔺哲广, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程的 nce-miR-23928 及其靶基因表达谱[J]. 微生物学通报, 2022-07-04.  
ZHANG WD, HU Y, ZHANG KY, QIAN JJ, ZHAO HX, JI T, LIN ZG, CHEN DF, GUO R. Expression profiles of nce-miR-23928 and its target genes in the infection process of *Apis mellifera ligustica* workers with *Nosema ceranae*[J]. *Microbiology China*, 2022-07-04 (in Chinese).

- [11] 吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加珺, 张文德, 余岢骏, 吉挺, 蔺哲广, 赵红霞, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-12220 及其靶基因的表达谱[J]. 菌物学报, 2022, 41(10): 1546-1557.  
WU Y, YE YP, ZHANG JX, QIAN JJ, ZHANG WD, YU KJ, JI T, LIN ZG, ZHAO HX, CHEN DF, GUO R. Expression profiles of nce-miR-12220 and its target genes during the *Nosema ceranae* infection process of *Apis mellifera ligustica* workers[J]. Mycosystema, 2022, 41(10): 1546-1557 (in Chinese).
- [12] 张凯遥, 张文德, 王紫馨, 胡颖, 钱加珺, 王思懿, 赵浩东, 顾小雨, 牛庆生, 付中民, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-10660 及其靶基因表达谱检测及分析[J]. 昆虫学报, 2022.  
ZHANG KY, ZHANG WD, WANG ZX, HU Y, QIAN JJ, WANG SY, ZHAO HD, GU XY, NIU QS, FU ZM, CHEN DF, GUO R. Analysis and detection of expression profiles of nce-miR-10660 and its target genes during the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers[J]. Acta Entomologica Sinica, 2022 (in Chinese).
- [13] 王思懿, 蔡宗兵, 赵浩东, 顾小雨, 钱加珺, 吉挺, 牛庆生, 陈大福, 郭睿. nce-miR-15338 及其靶基因在东方蜜蜂微孢子虫感染过程的表达谱[J]. 福建农林大学学报, 2023 (未发表录用).  
WANG SY, CAI ZB, ZHAO HD, GU XY, QIAN JJ, JI T, NIU QS, CHEN DF, GUO R. Expression patterns of nce-miR-15338 and its target genes in the infection process of *Nosema ceranae*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University, 2023 (in Chinese).
- [14] CHEN DF, CHEN HZ, DU Y, ZHOU DD, GENG SH, WANG HP, WAN JQ, XIONG CL, ZHENG YZ, GUO R. Genome-wide identification of long non-coding RNAs and their regulatory networks involved in *Apis mellifera ligustica* response to *Nosema ceranae* infection[J]. Insects, 2019, 10(8): 245.
- [15] GUO R, CHEN DF, XIONG CL, HOU CS, ZHENG YZ, FU ZM, LIANG Q, DIAO QY, ZHANG L, WANG HQ, HOU ZX, KUMAR D. First identification of long non-coding RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae*[J]. Apidologie, 2018, 49(5): 660-670.
- [16] CORNMAN RS, CHEN YP, SCHATZ MC, STREET C, ZHAO Y, DESANY B, EGHOLM M, HUTCHISON S, PETTIS JS, LIPKIN WI, EVANS JD. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(6): e1000466.
- [17] MASCARENHAS J, SOPPA J, STRUNNIKOV AV, GRAUMANN PL. Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(12): 3108-3118.
- [18] HAMEL LP, NICOLE MC, DUPLESSIS S, ELLIS BE. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers[J]. The Plant Cell, 2012, 24(4): 1327-1351.
- [19] 熊翠玲, 耿四海, 周丁丁, 石彩云, 郭意龙, 陈大福, 郑燕珍, 徐国钧, 张曦, 郭睿. 感染意大利蜜蜂工蜂的东方蜜蜂微孢子虫及其纯化孢子的高表达基因分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2019, 37(2): 6-13.  
XIONG CL, GENG SH, ZHOU DD, SHI CY, GUO YL, CHEN DF, ZHENG YZ, XU GJ, ZHANG X, GUO R. Analysis of highly expressed genes in *Nosema ceranae* infecting the midguts of *Apis mellifera ligustica* worker and purified fungal spores[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science), 2019, 37(2): 6-13 (in Chinese).
- [20] 耿四海, 周丁丁, 范小雪, 蒋海宾, 祝智威, 王杰, 范元婵, 王心蕊, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 陈大福, 郭睿. 转录组分析揭示东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂的分子机制[J]. 昆虫学报, 2020, 63(3): 294-308.  
GENG SH, ZHOU DD, FAN XX, JIANG HB, ZHU ZW, WANG J, FAN YC, WANG XR, XIONG CL, ZHENG YZ, FU ZM, CHEN DF, GUO R. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanism underlying *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(3): 294-308 (in Chinese).
- [21] 耿四海, 石彩云, 范小雪, 王杰, 祝智威, 蒋海宾, 范元婵, 陈华枝, 杜宇, 王心蕊, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 陈大福, 郭睿. 微小 RNA 介导东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂的分子机制[J]. 中国农业科学, 2020, 53(15): 3187-3204.  
GENG SH, SHI CY, FAN XX, WANG J, ZHU ZW, JIANG HB, FAN YC, CHEN HZ, DU Y, WANG XR, XIONG CL, ZHENG YZ, FU ZM, CHEN DF, GUO R. The mechanism underlying microRNAs-mediated *Nosema ceranae* infection to *Apis mellifera ligustica* worker[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(15): 3187-3204 (in Chinese).

- [22] 范小雪, 杜宇, 张文德, 王杰, 蒋海宾, 范元婵, 冯睿蓉, 万洁琦, 周紫彧, 熊翠玲, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿. 参与调控意大利蜜蜂工蜂中肠基因表达的东方蜜蜂微孢子虫 miRNA 的组学解析及其调控网络[J]. 昆虫学报, 2021, 64(2): 187-204.  
FAN XX, DU Y, ZHANG WD, WANG J, JIANG HB, FAN YC, FENG RR, WAN JQ, ZHOU ZY, XIONG CL, ZHENG YZ, CHEN DF, GUO R. Omics analysis of *Nosema ceranae* miRNAs involved in gene expression regulation in the midgut of *Apis mellifera ligustica* workers and their regulatory networks[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 64(2): 187-204 (in Chinese).
- [23] 杜宇, 范小雪, 蒋海宾, 王杰, 冯睿蓉, 张文德, 余尚骏, 隆琦, 蔡宗兵, 熊翠玲, 郑燕珍, 陈大福, 付中民, 徐国钧, 郭睿. 微小 RNA 介导意大利蜜蜂工蜂对东方蜜蜂微孢子虫的跨界调控[J]. 中国农业科学, 2021, 54(8): 1805-1820.  
DU Y, FAN XX, JIANG HB, WANG J, FENG RR, ZHANG WD, YU KJ, LONG Q, CAI ZB, XIONG CL, ZHENG YZ, CHEN DF, FU ZM, XU GJ, GUO R. MicroRNA-mediated cross-Kingdom regulation of *Apis mellifera ligustica* worker to *Nosema ceranae*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(8): 1805-1820 (in Chinese).
- [24] ISON J, KALAŠ M, JONASSEN I, BOLSER D, ULUDAG M, McWILLIAM H, MALONE J, LOPEZ R, PETTIFER S, RICE P. EDAM: an ontology of bioinformatics operations, types of data and identifiers, topics and formats[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(10): 1325-1332.
- [25] SEDAGHAT-NEJAD E, FAKHARIAN MA, PI J, HAGE P, KOJIMA Y, SOETEDJO R, OHMAE S, MEDINA JF, SHADMEHR R. P-sort: an open-source software for cerebellar neurophysiology[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2021, 126(4): 1055-1075.
- [26] BAILEY TL, ELKAN C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings*[J]. *International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 1994, 2: 28-36.
- [27] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [28] 祝智威, 王杰, 隆琦, 许雅静, 冯睿蓉, 刘佳美, 赵浩东, 朱乐冉, 侯海青, 陈大福, 郭睿. 过表达和敲减 ame-miR-13b 对意大利蜜蜂幼虫肠道内基因表达的影响[J]. 昆虫学报, 2022, 65(4): 460-468.  
ZHU ZW, WANG J, LONG Q, XU YJ, FENG RR, LIU JM, ZHAO HD, ZHU LR, HOU HQ, CHEN DF, GUO R. Impact of overexpression and knockdown of ame-miR-13b on the expression of genes in larval gut of *Apis mellifera ligustica*[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65(4): 460-468 (in Chinese).
- [29] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] 李莘, 牛勃, 王建华. I型磷脂酰肌醇 4-磷酸 5-激酶在神经发育性疾病中的作用及其机制研究[J]. 发育医学电子杂志, 2018, 6(2): 112-116.  
LI (S/X), NIU B, WANG JH. Study on the role and mechanism of type i phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in neurodevelopmental diseases[J]. *Journal of Developmental Medicine (Electronic Version)*, 2018, 6(2): 112-116 (in Chinese).
- [31] NARKIS G, OFIR R, LANDAU D, MANOR E, VOLOKITA M, HERSHKOWITZ R, ELBEDOUR K, BIRK OS. Lethal contractural syndrome type 3 (LCCS3) is caused by a mutation in PIP5K1C, which encodes PIPKI gamma of the phosphatidylinositol pathway[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2007, 81(3): 530-539.
- [32] HASSAN BA, PROKOPENKO SN, BREUER S, ZHANG B, PAULULAT A, BELLEN HJ. Skittles, a *Drosophila* phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, is required for cell viability, germline development and bristle morphology, but not for neurotransmitter release[J]. *Genetics*, 1998, 150(4): 1527-1537.
- [33] MARTÍNEZ-SOTO D, LEE MH. Functional analysis of the MAPK pathways in fungi[J]. *Revista Iberoamericana De Micología*, 2017, 34(4): 192-202.
- [34] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [35] SHIMAKAMI T, YAMANE D, JANGRA RK, KEMPF BJ, SPANIEL C, BARTON DJ, LEMON SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(3): 941-946.
- [36] ØROM UA, NIELSEN FC, LUND AH. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30(4): 460-471.